

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 293—298, Mai 1970

Die immunologische Identifizierung und Lokalisierung der Proteinfractionen nach disk-elektrophoretischer Trennung auf Polyacrylamidgel¹⁾

Von M. KRIEG²⁾ und H. WEICKER

*Aus der S. J. Thannhauser-Abteilung für Stoffwechseluntersuchungen (Vorstand: Prof. Dr. H. Weicker)
der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Heidelberg*

(Eingegangen am 29. Januar 1970)

Die immunologische Identifizierung des Disk-Elektrophorese-Spektrums wurde mit monovalentem Antiserum direkt auf dem Polyacrylamidgel nach elektrophoretischer Trennung von normalem Humanserum durchgeführt.

Folgende Proteine können durch Präzipitation im Gel nachgewiesen werden: α_1 -saures Glykoprotein, Präalbumin, Albumin, α_1 -Antitrypsin, α_1 -Lipoprotein, Coeruloplasmin, Hämoexin, Transferrin, β_1 -C/A-Globulin, Haptoglobin, α_2 -Makroglobulin, β -Lipoprotein, IgA und IgG.

α_1 -Lipoprotein, Hämoexin, α_1 -Antitrypsin, IgG, IgA sowie das α_1 -saure Glykoprotein repräsentieren keine mit Amidoschwarz anfärbbaren Banden, da sich z. T. mehrere Proteinfractionen überlagern.

The immunological identification and localisation of protein fractions, following disc-electrophoretic separation on polyacrylamide gel

1. The pattern of separation of normal human serum after disc electrophoresis was identified immunologically with monovalent antiserum directly on the polyacrylamide gel.

2. The following method was used:

- Identification by diffusion of monovalent into the gel column with the formation of the immunoprecipitate after a few hours.
- Electrophoretic washing of the gel column for 24—30 hr. to remove non-precipitated antigen and antiserum.
- Staining the immunoprecipitate with amido black 10 B.
- Correlation of the precipitation bands with those of serum separated under the same conditions and stained with amido black.

3. The following classes of proteins can be shown in the gel column by precipitation: α_1 -acidic glycoprotein, pre-albumin, albumin, α_1 -antitrypsin, α_1 -lipoprotein, caeruloplasmin, haemopexin, transferrin, β_1 -C/A-globulin, haptoglobin, α_2 -macroglobulin, β -lipoprotein, IgA and IgG.

4. The following results were obtained from the comparison with the separation pattern in disc electrophoresis:

- α_1 -lipoprotein, haemopexin, α_1 -antitrypsin, IgG, IgA, and α_1 -acidic glycoprotein do not represent bands detectable with amido black, since there is overlapping of protein bands.
- In fresh serum, β_1 -C/A-globulin consists of two fractions and in older serum it becomes three fractions.
- Five Hp fractions of the 2—2 type were detected immunologically between α_1 -macroglobulin and β -lipoprotein.
- β -lipoprotein migrates into 5% gel, while IgM remains at the starting point.

Die von ORNSTEIN (1) und DAVIS (2) entwickelte Disk-Elektrophorese-Technik an Polyacrylamidgel dürfte für die Proteintrennung eines der leistungsfähigsten Zonen-elektrophorese-Verfahren darstellen. Ihre diagnostische Verwendung in der Serumauftrennung wird jedoch durch die Schwierigkeit der Interpretation der zahlreichen Proteinfractionen eingeschränkt. Da die einzelnen Banden schon bei Normalserum in ihrer Lokalisation sehr variabel sind, und verschiedene Proteinfractionen durch Überlagerung bei der Amidoschwarzfärbung nicht zur Darstellung kommen, kann ihre Identifizierung nur immunologisch vorgenommen werden. Es war deshalb das Ziel dieser Untersuchungsreihe, die einzelnen Serumproteinfractionen des Disk-Elektrophorese-Spektrums durch eine technisch einfache Immunpräzipitationsmethode direkt auf dem Polyacrylamidgel zu identifizieren.

Material und Methode

Normales Humanserum wird mit dem Disk-Elektrophorese-apparat der Firma Shandon in 5proz. 6—7 cm langem Polyacrylamidgel-Zylinder getrennt. Die Zusammensetzung der Stammlösung für das Gelsystem erfolgt nach DAVIS (2). Das Serum wird mit 1M Saccharoselösung auf 1:10 verdünnt und in einer Menge von 40 μ l entsprechend 240—320 μ g Protein auf das Sammelgel aufgetragen. Die Anfangsstromstärke beträgt 2 mA, bei Erreichung der Sammelgel/Trenngelgrenze erhöhen wir auf 3 mA/Gel. 2 ml einer 0,001proz. Bromphenolblaulösung markiert während der etwa 90 Min. dauernden Elektrophorese die Proteinfrente.

Anschließend werden die Gele in kleine mit monovalentem Antiserum gefüllte Reagenzgläser (lichte Weite: etwa 7 mm, Länge: 8 cm, NS 12,5 Schliffstopfen) gebracht, die in einem von uns konstruierten Rotationsgerät um ihre Längsachse mit 50 U./Min. rotieren. Die Rotationsdauer und Diffusionszeit betragen je nach Fragestellung 2—3 oder max. rund 24 Stdn. Die 2 ml frisch zubereitete Reagenzglasfüllung bestehen im allgemeinen aus 1 ml Antiserum und 1 ml physiol. NaCl-Lösung. Sie kann bis zu fünfmal wiederverwandt werden. Liegt ein erheblicher Antigen-überschuß vor (wie z. B. beim Albumin), muß das Mischungsverhältnis und die Gesamtmenge des Antiserums variiert werden. Nach erfolgter Immundiffusion in das Trenngel lassen sich die

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

²⁾ Diese Arbeit enthält wesentliche Teile der Dissertation von M. KRIEG.

weißen Präzipitate mittels einer starken, diffusen Lichtquelle (Projektionslampe mit vorgesetztem Milchglasspalt) deutlich sichtbar machen und photographieren.

Eine Anfärbung der Immunpräzipitate mit Amidoschwarz 10 B gelingt nach vorheriger elektrophoretischer Auswaschung der Gele von nichtpräzipitierten Antigen- und Antiserumanteilen. Wir benutzen hierfür einen von der Firma Desaga für die Entfärbung von Gelzylindern hergestellten Apparat. Die Elektrophoresekammer wird mit einem auf 1:1000 verdünnten Puffer folgender Zusammensetzung gefüllt: 2,5 g Tris + 1,0 g Glycin ad 100 ml dest. Wasser pH 9,15; 1:1000 Verdünnung: pH 8,8. Mit diesem Puffer erhalten wir bei 9 mA konstant eingestellter Stromstärke eine Spannung von 220–260 V. Ein in der ersten Phase der elektrophoretischen Auswaschung erfolgender Spannungsabfall auf 50 V und darunter wird durch mehrmaliges Wechseln des Puffers ausgeglichen. Drei Gele sind gleichzeitig in der Kammer auf einem Netz horizontal fixiert. Die Auswaschung der nicht präzipitierten Proteine erfolgt vertikal und ist spätestens nach 30 Stdn. beendet.

Die anschließende Färbung mit Amidoschwarz 10 B dauert 30 Min. Die Entfärbung gelingt innerhalb von 12–16 Stdn. in einem 7proz. Essigsäurebad. Eine schnellere Entfärbung kann elektrophoretisch im Disk-Elektrophoreseapparat durchgeführt werden. Eine Beschreibung findet sich bei MAURER (3).

Ergebnisse

Folgende Befunde lassen sich nach Disk-Elektrophorese und Diffusion von monovalenten Antiseren erheben:

Präalbumin wandert als diskrete Bande auch bei Untersuchungen desselben Humanserums mit unterschiedlich schneller Geschwindigkeit. In der Regel liegt es vor dem Albumin, gibt eine scharfe Präzipitation mit Anti-Präalbuminserum und erlaubt eine exakte Zuordnung zum Disk-Elektropherogramm. In einzelnen Trennungen löst sich jedoch das Präalbumin trotz gleicher technischer Voraussetzungen nicht von der Albuminfraktion und kann dann nur durch monovalente Immunpräzipitation nachgewiesen werden (s. Abb. 1).

α_1 -saures Glykoprotein als kohlenhydratreichstes, neuraminsäurehaltiges Serum-Glykoprotein wandert schneller als Präalbumin und wird bei der im Serum vorliegenden Konzentration nicht mit wäßr., essigsäurem Amidoschwarz angefärbt. Der Nachweis im Trenngel gelingt

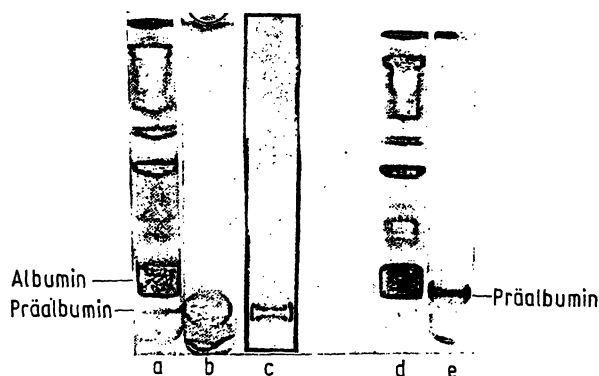


Abb. 1

Identifizierung von Präalbumin. a = Disk-Elektrophorese von Humanserum mit isolierter Präalbuminbande. b = Angefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti-Präalbuminserum gegen Humanserum. c = Ungefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti-Präalbuminserum gegen Humanserum. d = Disk-Elektrophorese vom selben Humanserum wie in a ohne sichtbare Präalbuminbande. e = Angefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti-Präalbuminserum gegen Humanserum. Erst durch die Immunpräzipitation kann in dieser Trennung das Präalbumin nachgewiesen werden.

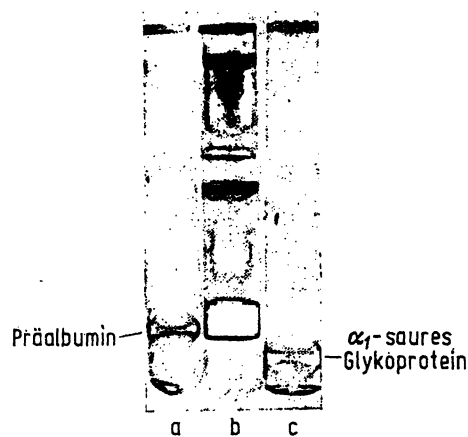


Abb. 2

Identifizierung von α_1 -saurem Glykoprotein. a = Disk-Elektrophorese von Humanserum. b = Angefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti- α_1 -saurem Glykoproteinserum gegen Humanserum. c = Ungefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti- α_1 -saurem Glykoproteinserum gegen Humanserum. Eine Zuordnung zu einer Bande der Abb. a ist nicht möglich.

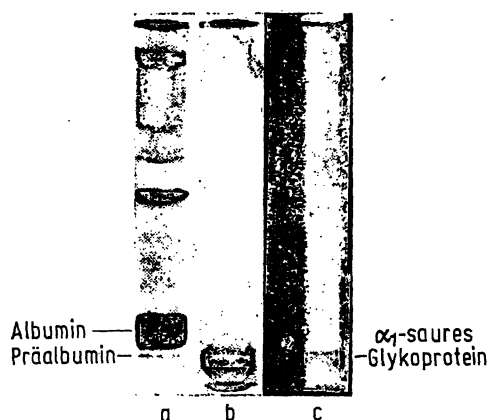


Abb. 3

Identifizierung von α_1 -saurem Glykoprotein und Präalbumin. a = Angefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti-Präalbuminserum gegen Humanserum. b = Disk-Elektrophorese von Humanserum ohne sichtbare Präalbuminbande. c = Angefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti- α_1 -saurem Glykoprotein gegen Humanserum. Die Abb. zeigt deutlich, daß das α_1 -saure Glykoprotein schneller als das Präalbumin wandert, sich aber in keinem Fall im Disk-Elektropherogramm darstellen läßt.

nur durch die monovalente Immunpräzipitation, die sich gut mit Amidoschwarz darstellen läßt (s. Abb. 2 und 3).

Das α_1 -Antitrypsin wandert mit gleicher Geschwindigkeit wie die Albuminfraktion und stellt deshalb keine eigene Bande im Disk-Elektropherogramm dar. Erst durch die Immunpräzipitation wird seine Lokalisation in der Albuminbande erkennbar.

Auch das α_1 -Lipoprotein ist im Elektropherogramm nicht sichtbar. Die ungefärbte, breite Immunpräzipitation mit monovalentem Anti- α_1 -Lipoproteinserum zeigt jedoch deutlich seine Lokalisation, die vom Albuminbereich bis zur Doppelbande des Coeruloplasmins reicht (s. Abb. 4).

Das Immunpräzipitat des Coeruloplasmins erlaubt eine Zuordnung zu den beiden nächstliegenden Banden anodisch vom Transferrin.

Das Transferrin selbst zeigt mit monovalentem Antiserum eine scharf begrenzte Präzipitationslinie, die sich eindeutig der mit Amidoschwarz angefärbten Bande zuordnen läßt.

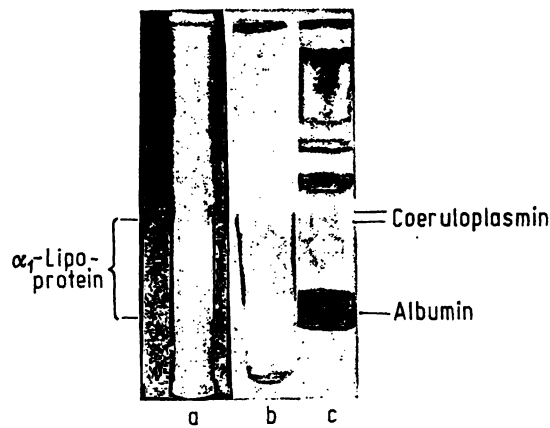


Abb. 4

Identifizierung von α_2 -Lipoprotein. a = Ungefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti- α_2 -Lipoproteinserum gegen Humanserum. b = Angefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti- α_2 -Lipoproteinserum gegen Humanserum. c = Disk-Elektrophorese von Humanserum

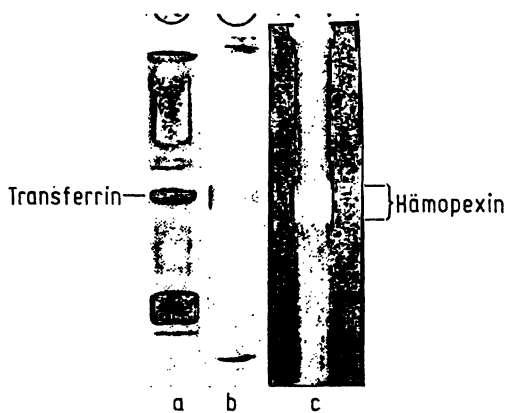


Abb. 5

Identifizierung von Hämoexin. a = Disk-Elektrophorese von Humanserum. b = Angefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti-Hämoexinserum gegen Humanserum. c = Ungefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti-Hämoexinserum gegen Humanserum

Im Disk-Elektropherogramm ist das *Hämoexin* dagegen nicht eindeutig dargestellt. Das diffuse Immunpräzipitat beginnt vor dem kathodischen Rand des Transferrins und erreicht anodisch fast das Coeruloplasmin. Statt der sonst üblichen 1 : 1 Verdünnung benutzen wir beim Hämoexin eine 1 : 4 Verdünnung (d. h. 0,5 ml/ Anti-Hämoexinserum + 1,5 ml/ physiol. NaCl-Lösung) mit einer weit besseren Ausbildung des Immunpräzipitates (s. Abb. 5).

Mit der hier vorgeschlagenen Technik konnten wir erstmalig das β_1 -C-Globulin und sein Transformationsprodukt disk-elektrophoretisch identifizieren. Im frischen Serum nach Blutentnahme sind 2 Fraktionen durch Immundiffusion mit Anti- β_1 -C/A-Globulinserum nachzuweisen und im Disk-Pherogramm den beiden eng zusammenliegenden Banden kathodisch vom Transferrin zuzuordnen (s. Abb. 6). Nach 20 Tagen findet sich in demselben Serum neben den beiden identifizierten Fraktionen eine dritte, schneller wandernde Fraktion, die ebenfalls mit Anti- β_1 -C/A-Globulinserum präzipitiert (s. Abb. 7). Auf die Beobachtung des genauen zeitlichen Verlaufs der Transformation des β_1 -C-Globulins wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

Die einzelnen *Haptoglobin*-Fraktionen lassen sich mit unserer Technik immunologisch darstellen und den angefärbten Banden des Disk-Pherogramms zuordnen. Die 4—5 Fraktionen des Hp 2-2 zwischen β -Lipoprotein und α_2 -Makroglobulin (s. Abb. 9) sind jedoch so fein, daß sie nur im Trenngel und nicht auf photographischen Abbildungen zu erkennen sind. Dabei wird deutlich, daß sowohl in den beiden α_2 -Makroglobulinbanden als auch in der kathodisch gelegenen Fraktion des β_1 -C/A-Globulins Haptoglobulinkomponenten zu finden sind.

In der Disk-Elektrophorese wurden die zwei eng zusammenliegenden und deutlich erkennbaren Banden im kathodischen Drittel des Gels schon in früheren Untersuchungen als α_2 -Makroglobulin nominiert und konnten mit der Immundiffusion von uns bestätigt werden. Zu bemerken ist, daß sowohl in ganz frisch entnommenem Blut als auch in gealtertem Serum zwei Fraktionen vorliegen. Eine Variation wurde von uns lediglich in der Intensität der Färbung der beiden Banden gefunden. Bei Verwendung von 5% Trenngel wandert in der Disk-Elektrophorese das β -Lipoprotein 1—2 mm in das

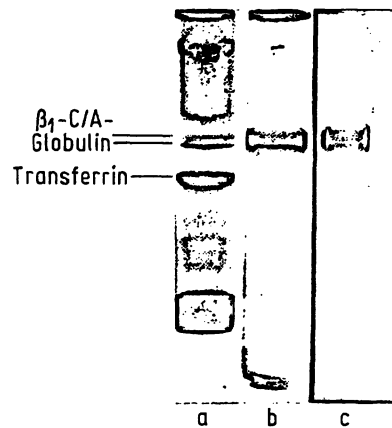


Abb. 6

Identifizierung von β_1 -C/A-Globulin (30 Min. altes Serum). a = Disk-Elektrophorese von Humanserum. b = Angefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti- β_1 -C/A-Globulinserum gegen Humanserum. c = Ungefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti- β_1 -C/A-Globulinserum gegen Humanserum. Beachte die Doppelung der Pherogramm-Bande und der Immunpräzipitate!

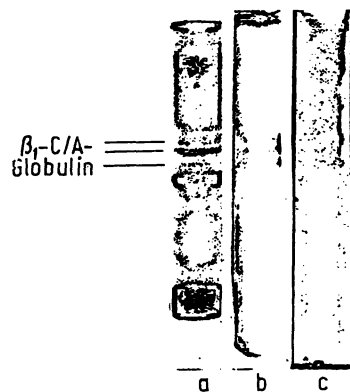


Abb. 7

Identifizierung von β_1 -C/A-Globulin (20 Tage altes Serum). a = Disk-Elektrophorese von Humanserum. b = Angefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti- β_1 -C/A-Globulinserum gegen Humanserum. c = Ungefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti- β_1 -C/A-Globulinserum gegen Humanserum. Beachte das neu hinzugekommene Transformationsprodukt

Trenngel ein. Das Immunpräzipitat im Gel ergibt ebenfalls eine scharf begrenzte Fraktion. Die von uns durchgeführte Identifizierung der *Immunglobuline* nach disk-elektrophoretischer Trennung zeichnet sich vor allem durch die überraschend schlechte Anfärbbarkeit des IgG-Präzipitats aus. Eine klare Zuordnung zum Disk-Elektropherogramm ist uns nicht gelungen. Es wird lediglich deutlich, daß die Hauptmenge als diffuse Zone im Haptoglobulinbereich liegt, und daß sie von dort sowohl kathodisch als auch anodisch in unscharfer Begrenzung ausläuft. Auffallend ist der geringe IgG-Anteil im Bereich zwischen α_2 -Makroglobulin und β -Lipoprotein. Besser läßt sich das IgA darstellen und im Disk-Pherogramm erstmalig klar lokalisieren. Es repräsentiert wie das IgG keine selbständige Bande, sondern bildet eine Zone aus, die jedoch schmaler und mit den Präzipitationsbögen deutlicher als die des IgG abgrenzbar ist. Aus dem Vergleich mit dem IgG ergibt sich weiterhin, daß es ungefähr mit dem anodischen Abschnitt des IgG zusammenfällt (s. Abb. 8). Das IgM-Immunglobulin tritt nicht in das Trenngel ein.

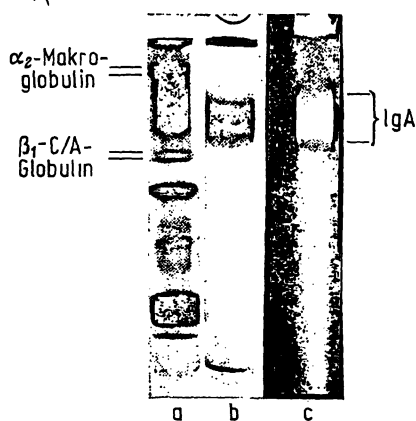


Abb. 8

Identifizierung von IgA. a = Disk-Elektrophorese von Humanserum. b = Angefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti-IgA-Serum gegen Humanserum. c = Ungefärbtes Immunpräzipitat im Gelsäulchen nach Diffusion von Anti-IgA-Serum gegen Humanserum

In der Disk-Elektrophorese ist die *Albumin*bande im vorderen Drittel des Gelsäulchens von allen Fraktionen am intensivsten mit Amidoschwarz anfärbt und bedarf an sich keiner weiteren Identifizierung. Überraschenderweise stellt sich jedoch das Albuminpräzipitat sehr schwer dar, und nur durch die Variation der Antigen-Antikörper-Relation (0,02 ml 1:10 verdünntes Serum statt 0,4 und 0,5 ml unverdünntes Antiserum statt 1 ml Antiserum + 1 ml physiol. NaCl-Lösung) läßt sich ein nicht einmal vollständiges Immunpräzipitat sichtbar machen. In einem Trennlauf fanden sich nach Diffusion von Anti-Albuminserum drei weitere Präzipitationen im Postalbuminbereich. Eine Zuordnung zum Disk-Elektropherogramm war jedoch nicht eindeutig möglich.

Abschließend sind alle von uns identifizierten Proteinfractionen schematisch dargestellt (s. Abb. 9).

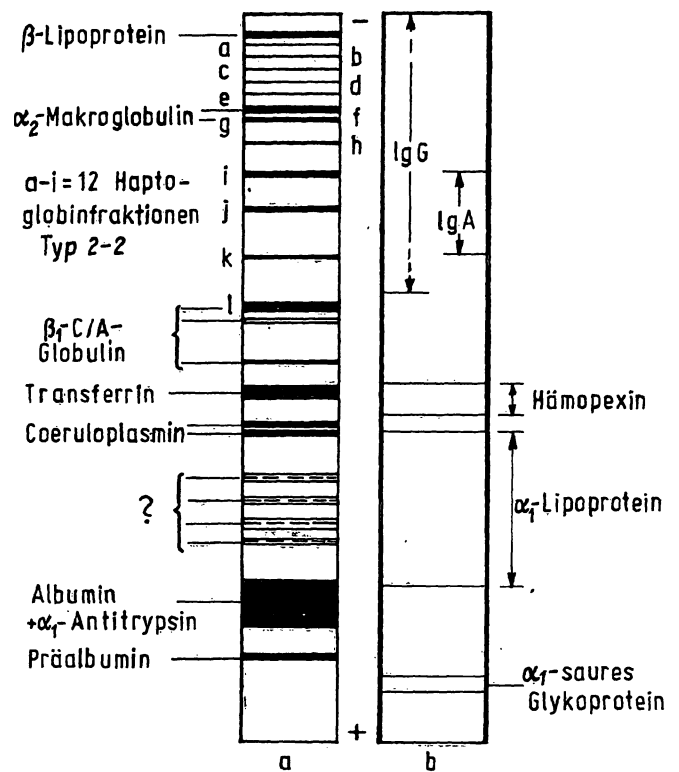


Abb. 9

Schematische Darstellung der hier immunologisch identifizierten Serumproteine nach disk-elektrophoretischer Trennung. a = Lokalisierung der diskreten Banden: β -Lipoprotein, α_2 -Makroglobulin, die etwa 12 Haptoglobinfractionen des Typs 2-2, β_1 -C/A-Globulin, Transferrin, Coeruloplasmin, Albumin, α_1 -Antitrypsin, Präalbumin. Die f-, g- und l-Fraktion des Hp 2-2 fallen in diesem Serum mit α_2 -Makroglobulin bzw. β_1 -C/A-Globulin zusammen. Die mit einem Fragezeichen versehenen vier Fraktionen im Postalbuminbereich konnten wir nicht eindeutig identifizieren. b = Darstellung der Serumproteine, die keine anfärbbaren diskreten Banden, sondern Zonen ausbilden, die erst durch spezifische Immunpräzipitationen sichtbar werden; IgG, IgA, Hämoexin, α_1 -Lipoprotein, α_1 -saure Glykoprotein

Diskussion

Da die optimale Trennleistung der Disk-Elektrophorese für klinische Fragestellungen nur bei eindeutiger Identifizierung der erhaltenen Proteinbanden eingesetzt werden kann, wurde mit einer hier entwickelten Immunpräzipitationstechnik in den Polyacrylamidgel-Zylindern eine Identifizierung der Eiweißfraktionen mit monovalenten Antiseren durchgeführt. Mit dieser Technik erhoben wir in einer für Immunpräzipitationsnachweise relativ kurzen Zeit von 2–24 Stdn. gut reproduzierbare Befunde. Die Rotation der Gelzylinder im Antiserumgemisch rationalisiert den Antiserumverbrauch und garantiert gleichmäßige Diffusionsbedingungen. Gegenüber den Arbeiten von BIEL und ZWISLER, BEDNARIK u. a. (4–9) konnte auf eine Diffusion der polyacrylamidgel-getrennten Eiweißfraktionen in Agargel verzichtet werden. Hierdurch wurden die technische Durchführung einfacher, die Fehlerquelle reduziert und die Versuchsdauer erheblich verkürzt. Die ungefärbten monovalenten Immunpräzipitate ermöglichen nach spätestens 3 Stdn. eine Identifizierung der Serumproteine im Trenngel. Die definitive Dokumentierung wird durch die Amidoschwarz-Färbung der Immunpräzipitate erreicht und gelingt nach elektrophoretischer Auswaschung der Trenngel von nicht präzipitierten Proteinen.

Durch eine für die Polyacrylamidgel-Entfärbung beschriebene Apparatur nach MAURER (10) ist zu erwarten, daß sich die jetzige Auswaschzeit von 30 Stdn. erheblich verkürzt, da in diesem Gerät das gesamte elektrische Feld nur über die Gele von Pol zu Pol aufgebaut und damit der elektrophoretische Auswaschzeit potenziert werden.

Neben den methodischen Vorteilen zeigen die Befunde, daß die hier angewandte Technik für die in der Identifizierung auch schwer lokalisierbarer Serumproteinfractionen besonders gut geeignet ist.

Im Präalbuminbereich finden BIEL und ZWISLER (4, 5) mit der OSSERMANN-Technik sowie SCHMIDT (11) durch Vergleichsuntersuchungen gereinigter Serumkomponenten, daß das α_1 -saure Glykoprotein zwischen Albumin und Präalbumin lokalisiert ist, während GEYER und Mitarbeiter (12) das α_1 -saure Glykoprotein der Präalbuminbande zuordnen und das immunologisch definierte Präalbumin in die Albuminbande verlegen. Wir fanden, daß sich das α_1 -saure Glykoprotein als kohlenhydratreichstes Protein des Serums nicht mit wäßr., essigsaurem Amidoschwarz anfärbt. Als Erklärung hierfür kann die Tatsache angeführt werden, daß Glykoproteine dieses hohen Kohlenhydratgehaltes in 7proz. Essigsäure nicht fällbar sind und somit vor allem bei elektrophoretischer Entfärbung der Gele aus denselben herauswandern. Im immunologischen Nachweis ist das α_1 -saure Glykoprotein eindeutig als schnellste Fraktion der Disk-Trennung anzusprechen (s. Abb. 2 u. 3).

Nach manchen Trennungen fiel in unseren Versuchen das Präalbumin mit der Albuminbande zusammen. Wird jedoch eine Präalbuminbande im Disk-Elektropherogramm färberisch dargestellt, entspricht ihre Lokalisation immer dem monovalenten Anti-Präalbuminpräzipitat (s. Abb. 1).

Im Albuminbereich ist neben der Hauptfraktion Albumin, α_1 -Antitrypsin, ein Teil des α_1 -Lipoproteins und u. U. Präalbumin lokalisiert. Die Amidoschwarz-Intensität des „Albumin“ kann durch diese Komponenten potenziert werden.

Im Postalbuminbereich konnte die von CLARKE (13) und BIEL und ZWISLER (4) beschriebene Lokalisation des Coeruloplasmins bestätigt werden. Wir fanden jedoch zwei Banden, die dem von MORELL und SCHEINBERG (14) mit der Stärkegel-Elektrophorese erhobenen Befund entsprechen könnten. Die Autoren nehmen eine Heterogenität des Coeruloplasmins an. Bei der Antigenidentität ist ein unterschiedlicher Aggregationszustand der beiden Coeruloplasminfraktionen am wahrscheinlichsten. Die übrigen Proteinbanden des Postalbuminbereichs konnten wir mit den zur Verfügung stehenden monovalenten Antiseren nicht identifizieren. PASTEWKA und Mitarbeiter (15) und PEACOCK und Mitarbeiter (16) sowie BIEL und ZWISLER (4) nehmen an, daß hier die Gc-Globuline und das α_2 -HS-Globulin lokalisiert seien. Da das handelsübliche Anti-Gc-Globulinserum jedoch zusätzlich Anti- α_1 -Lipoprotein enthält, das über den gesamten Postalbuminbereich diffus wandert (s. Abb. 4), kann mit unserer Technik eine sichere immunologische

Identifizierung der Gc-Globuline nicht durchgeführt werden. Anti- α_2 -HS-Globulinserum stand uns nicht zur Verfügung. Weiterhin sind in diesem Bereich die von GEYER und Mitarbeitern (12) diskutierten Albuminaggregationen zu berücksichtigen.

In dem nachfolgenden kathodischen Abschnitt der Gelzylinder läßt sich Hämoexin nur immunologisch zwischen Transferrin und Coeruloplasmin nachweisen (s. Abb. 5). Die Präzipitationslinie des Transferrin entspricht der aus dem Disk-Elektropherogramm bekannten Lokalisation.

Durch die Immunpräzipitation mit monovalentem β_1 -C/A-Globulinserum konnten wir erstmalig zeigen, daß bereits 30 Min. nach Entnahme des Serums zwei immunologisch identische Fraktionen vorliegen (s. Abb. 6). Da sich nach 20tägiger Lagerung desselben Serums eine dritte Fraktion mit Anti- β_1 -C/A-Globulinserum nachweisen läßt (s. Abb. 7), möchten wir diese Fraktion als das von MÜLLER-EBERHARD und Mitarbeitern (17) beschriebene Transformationsprodukt β_1 -A-Globulin ansprechen. Die in frischem Serum beobachtete Doppelbande würde demnach zwei Aggregationszuständen des β_1 -C-Globulins entsprechen.

Leider hat sich die Hoffnung nicht erfüllt, den γ -Globulinbereich des Disk-Gels mit der Präzipitationstechnik weiter zu differenzieren, um neue Informationen über die Immunglobuline zu erhalten. Wir können jedoch mit dieser Methode relativ genau die Lage des IgA festlegen (s. Abb. 8). Letztlich bestimmen drei große Proteinfractionen das Bandenbild des γ -Globulinbereichs: Haptoglobin, α_2 -Makroglobulin und β -Lipoprotein (s. Abb. 9). Durch die Unbeweglichkeit des β -Lipoproteins können wir die unmittelbare Startzone nicht untersuchen. Die Identifizierung des β -Lipoproteins zeigt jedoch, daß diese Fraktion vollständig in das 5proz. Trenngel einwandert, während das IgM am Startpunkt liegenbleibt.

Die Immundiffusion von polyvalenten Antiseren in das Trenngel führte schon BEDNARIK (7) in der horizontalen, kontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese durch, ohne überzeugende Ergebnisse zu erzielen. Auch in unserem Fall bilden sich nicht mehr als 10 Präzipitationsbanden aus. Durch die teilweise Überlagerung mehrerer Fraktionen im Trenngel ist eine bessere Auflösung nicht zu erwarten. Bei Verwendung von polyvalentem Antiserum ist deshalb die von BIEL und ZWISLER (4, 5) verwandte Technik zu empfehlen, da die Fraktionen durch die Diffusion in Agarose eine zusätzliche Trennung erfahren.

Die Überlagerung einzelner Proteinfractionen führt im Disk-Elektropherogramm zu Interpretationsschwierigkeiten und schließt exakte quantitative Aussagen durch Densitometrie (11, 18) aus. So ist beispielsweise die scharf begrenzte Amidoschwarzbande im Albuminbereich eine Summation von Albumin, α_1 -Antitrypsin, α_1 -Lipoprotein und u. U. auch von Präalbumin. Eine Änderung der Bandenintensität ist folglich nicht in jedem Fall mit einer Albuminvermehrung oder -verminderung identisch. Summationen verschiedener Pro-

teinfraktionen liegen, wie die Ergebnisse zeigen (s. Abb. 9), auch im Postalbuminbereich, in der Hämo-
pexin-Zone und im gesamten γ -Globulinbereich vor.
Weiterhin zeigen mehrere Arbeiten (15, 16, 18, 19), daß
in Normalseren Anzahl und Intensität der Banden sehr
variabel sind. Durch die Vielzahl dieser eng beieinander-
liegenden Banden können nur markante Veränderungen
oder Vermehrungen im Disk-Elektropherogramm re-

gistriert werden (11, 13, 20–22), verbindliche diagno-
stische Aussagen sind jedoch nur nach immunologischer
Identifizierung dieser Fraktionen möglich. Hierfür er-
scheint uns die hier entwickelte Methode geeignet, da
sie die Interpretation der Banden schnell und sicher er-
laubt. Als besonders wertvoll erweist sie sich für die
Fälle, in denen färberisch nicht erfassbare Proteinfrak-
tionen nachzuweisen sind.

Literatur

1. ORNSTEIN, L., *Annals N. Y. Acad. Sc.* 121, 321 (1964). — 2. DAVIS, B. J., *Annals N. Y. Acad. Sc.* 121, 404 (1964). — 3. MAURER, H. R., *Disk-Elektrophorese, Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese*, Walter de Gruyter & Co., Berlin (1968). — 4. BIEL, H. und O. ZWISLER, *Behringwerk-Mitt.*, 46, 141 (1966). — 5. ZWISLER, O. und H. BIEL, *Behringwerk-Mitt.*, 46, 129 (1966). — 6. BEDNARIK, T., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 17, 132 (1967). — 7. BEDNARIK, T., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 15, 172 (1967). — 8. DARCY, D. A., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 21, 161 (1968). — 9. AFONSO, E., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 10, 114 (1964). — 10. MAURER, H. R., *diese Z.* 4, 85 (1966). — 11. SCHMIDT, U., *Med. Dissertation, Univ.-Heidelberg* (1969). — 12. GEYER, E., S. MARGHESCU und J. J. MÜLLER, *Klin. Wschr.* 45, 717 (1967). — 13. CLARKE, J. T., *Annals N. Y. Acad. Sc.* 121, 428 (1964). — 14. MORELL, A. G. und I. M. SCHEINBERG, *Science, Washington* 131, 930 (1960). — 15. PASTEWKA, J. V., A. T. NESS und A. C. PEACOCK, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 14, 219 (1966). — 16. PEACOCK, A. C., S. L. BUNTING und K. G. QUEEN, *Science, Washington* 147, 1451 (1965). — 17. MÜLLER-EBERHARD, H. J., U. NILSSON und T. ARONSSON, *J. Exper. Med.*, 111, 201 (1960). — 18. DELANK, H. W., *Klin. Wschr.* 46, 779 (1968). — 19. FÄLGENHAUER, K. S., S. BACH und A. STAMMLER, *Klin. Wschr.* 45, 371 (1967). — 20. ISICHEI, U. P., *Med. Dissertation, Univ. München* (1966). — 21. ZINGALE, S. B., C. A. MATTIOLI, H. D. BOHNER und M. P. BUENO, *Blood*, 22, 152 (1963). — 22. PRICE, W. H., H. HARRISON und S. H. FEREBEE, *Annals N. Y. Acad. Sc.* 121, 460 (1964).

Prof. Dr. H. Weicker
6900 Heidelberg
Hospitalstr. 3